

Requested document:	JP2003156442 click here to view the pdf document
---------------------	--

No English title available.

Patent Number:

Publication date: 2003-05-30

Inventor(s):

Applicant(s):

Requested Patent: ☐ [JP2003156442](#)

Application Number: JP20010358581 20011122

Priority Number(s): JP20010358581 20011122

IPC Classification: C12Q1/68; G01N21/64; C12N15/09; G01N21/55; G01N33/53; G01N37/00

EC Classification: [G01N21/64P2](#), [G01N21/64P4](#), [G01N21/64R](#)

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a data collection method for DNA micro array capable of collecting automatically fluorescent data from the DNA micro array without troubling a person. SOLUTION: This invention provides the method for collecting data on bio-molecule micro array. A fluorescence-labeled target bio-molecule is interacted with the bio-molecule micro array having a plurality of bio-molecule probe immobilized spots on a light reflecting layer spot on a substrate surface, in the method. The obtained bio-molecule micro array is irradiated with an excitation ray, reflected light and fluorescence from the bio-molecule micro array are measured concurrently, the bio-molecule probe immobilized spots having the light reflecting layer spot is specified based on a difference in intensity of the reflected light on the bio-molecule micro array, and the fluorescent data from a specified spot range is provided. Alternatively, the obtained bio-molecule micro array is irradiated with light, the reflected light from the bio-molecule micro array is measured, the bio-molecule probe immobilized spots having the light reflecting layer spot is specified based on a difference in intensity of the reflected light on the bio-molecule micro array, only a specified bio-molecule probe immobilized spot range is irradiated with an excitation light to measure the fluorescence, and the fluorescent data from the specified spot range are obtained thereby.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-156442

(P2003-156442A)

(43) 公開日 平成15年5月30日 (2003.5.30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	F 2 G 0 4 3
C 1 2 N 15/09		21/55	2 G 0 5 9
G 0 1 N 21/55		33/53	M 4 B 0 2 4
33/53		37/00	1 0 2 4 B 0 6 3
37/00	1 0 2	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-358581(P2001-358581)

(22) 出願日 平成13年11月22日 (2001.11.22)

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72) 発明者 田代 英夫

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72) 発明者 近藤 恭光

埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(74) 代理人 110000109

特許業務法人特許事務所サイクス (外 3
名)

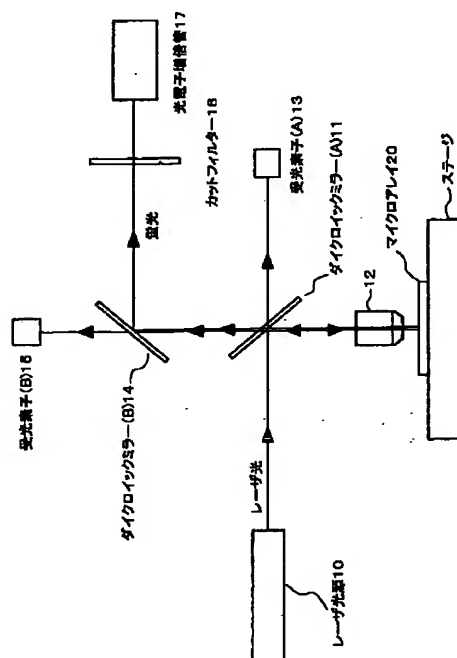
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体分子マイクロアレイのデータ収集方法

(57) 【要約】

【課題】 DNAマイクロアレイからの蛍光データの収集を、人手を煩わすことなく自動で行うことができる、DNAマイクロアレイのデータ収集方法を提供する。

【解決手段】 生体分子マイクロアレイのデータ収集方法。光反射層スポット上の生体分子プローブ固定スポットを基板表面に複数個有する生体分子マイクロアレイに、蛍光標識されたターゲット生体分子を相互作用させる。得られた生体分子マイクロアレイに励起光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光及び蛍光を同時に計測し、生体分子マイクロアレイ上の反射光の強度の違いから、光反射層スポットを有する生体分子プローブ固定スポットを特定し、特定されたスポット範囲からの蛍光データを得る。または得られた生体分子マイクロアレイに光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光を計測し、生体分子マイクロアレイ上の反射光の強度の違いから、光反射層スポットを有する生体分子プローブ固定スポットを特定し、特定された生体分子プローブ固定スポット範囲のみに励起光を照射して蛍光を測定し、特定されたスポット範囲からの蛍光データを得る。



【特許請求の範囲】

【請求項1】光反射層スポット上に生体分子プローブが固定された生体分子プローブ固定スポットを基板表面に複数個有する生体分子マイクロアレイに、蛍光標識されたターゲット生体分子を相互作用させ、得られた生体分子マイクロアレイに励起光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光及び蛍光を同時に計測し、生体分子マイクロアレイ上の反射光の強度の違いから、光反射層スポットを有する生体分子プローブ固定スポットを特定し、特定されたスポット範囲からの蛍光データを得ることを含む、生体分子マイクロアレイのデータ収集方法。

【請求項2】光反射層スポット上に生体分子プローブが固定された生体分子プローブ固定スポットを基板表面に複数個有する生体分子マイクロアレイに、蛍光標識されたターゲット生体分子を相互作用させ、得られた生体分子マイクロアレイに光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光を計測し、生体分子マイクロアレイ上の反射光の強度の違いから、光反射層スポットを有する生体分子プローブ固定スポットを特定し、特定された生体分子プローブ固定スポット範囲のみに励起光を照射して蛍光を測定し、特定されたスポット範囲からの蛍光データを得ることを含む、生体分子マイクロアレイのデータ収集方法。

【請求項3】前記特定されたスポット範囲を、生体分子マイクロアレイ上の光反射層スポットとそれ以外の生体分子マイクロアレイ表面との反射率の相違から検出することを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】前記光反射層スポットは、前記生体分子プローブ固定化用スポットと、実質的に同一の平面形状を有する請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】生体分子プローブ固定スポットに照射する光または励起光がレーザ光である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】前記ターゲット生体分子がDNA、RNA、cDNA、mRNAまたはタンパク質である請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】前記特定されたスポット範囲のみからの蛍光データが、蛍光強度のスポット範囲での積算値、平均値または中間値として得られる請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】前記特定されたスポット範囲のみからの蛍光データが、蛍光強度のスポット範囲での積算値、平均値または中間値として、各蛍光波長毎に得られる請求項7に記載の方法。

【請求項9】生体分子マイクロアレイ上の各スポットについて順次、前記蛍光データが収集される請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】生体分子マイクロアレイ上の複数のスポットについてスポット範囲の特定を行い、次いで、スポット範囲が特定された各スポットが発する蛍光を順次計

測し、予め特定されたスポット範囲のデータを用いて、該スポット範囲のみからの蛍光データが、連続的に収集される請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】生体分子マイクロアレイ上の一部の領域の生体分子プローブ固定スポットの特定を行い、特定された一部のスポット位置から、全体の生体分子プローブ固定スポットの位置を計算し、該スポット範囲を特定する請求項10に記載の方法。

【請求項12】生体分子マイクロアレイ上の全てのスポットについてスポット範囲の特定を予め行う請求項10に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体分子マイクロアレイのデータ収集方法に関する。

【0002】

【従来の技術】遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析できるDNAマイクロアレイは、1枚につき数千～数万の遺伝子を解析する。従来のDNAマイクロアレイは、DNAをスタンピングする装置(DNAアレイヤー)を用い、先が割れたクイルピンでDNAを吸い取り、スライドガラスに4～48本程度のクイルピンを同時に打ち付けることによりDNAスポットを作製する。このようにして作製されたDNAスポットは、形状や面積が一定していないため、再現性や定量性に悪影響を与える。また、DNAスポットの位置は、クイルピンごとに曲がっている向きが異なっていたり、クイルピンがスタンピング時にそれぞれ回転することで、それぞれのDNAスポットが正確に整列することなくDNAスポットはゆがみが生じる結果となる。このようにして作製されたDNAマイクロアレイは、蛍光標識した核酸試料をハイブリダイゼーション反応させた後、共焦点蛍光顕微鏡をベースにした蛍光スキャナーによりDNAマイクロアレイ全体の蛍光像を取得する。

【0003】DNAマイクロアレイの蛍光像は、そのままではスポットごとの蛍光強度を測定することができないため、解析用ソフトウェアにより、グリiddingという操作を行う。グリiddingは、アレイ上のスポットの縦横の数やスポットの間隔、スポットの直径の大きさを入力し、スポットを円で囲む操作をいう。このグリiddingは、スポットの位置がずれていると正確に囲むことができないため、ソフトウェアにより、自動で位置を補正する機能がついている。しかるに、すべての操作が自動になっているわけではなく、手でスポットの開始点の設定や目視によりすべてのスポットのグリッドを確認し補正する必要がある。そのため、この操作は、非常に煩雑であり、DNAスポットの数が数千以上になると非常に時間がかかる作業となり、解析スピードを遅らせる要因となっている。

【0004】そこで本発明は、DNAマイクロアレイか

らの蛍光データの収集を、人手を煩わすことなく自動で行うことができる、DNAマイクロアレイのデータ収集方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】〔請求項1〕光反射層スポット上に生体分子プローブが固定された生体分子プローブ固定スポットを基板表面に複数個有する生体分子マイクロアレイに、蛍光標識されたターゲット生体分子を相互作用させ、得られた生体分子マイクロアレイに励起光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光及び蛍光を同時に計測し、生体分子マイクロアレイ上の反射光の強度の違いから、光反射層スポットを有する生体分子プローブ固定スポットを特定し、特定されたスポット範囲からの蛍光データを得ることを含む、生体分子マイクロアレイのデータ収集方法。

〔請求項2〕光反射層スポット上に生体分子プローブが固定された生体分子プローブ固定スポットを基板表面に複数個有する生体分子マイクロアレイに、蛍光標識されたターゲット生体分子を相互作用させ、得られた生体分子マイクロアレイに光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光を計測し、生体分子マイクロアレイ上の反射光の強度の違いから、光反射層スポットを有する生体分子プローブ固定スポットを特定し、特定された生体分子プローブ固定スポット範囲のみに励起光を照射して蛍光を測定し、特定されたスポット範囲からの蛍光データを得ることを含む、生体分子マイクロアレイのデータ収集方法。

〔請求項3〕前記特定されたスポット範囲を、生体分子マイクロアレイ上の光反射層スポットとそれ以外の生体分子マイクロアレイ表面との反射率の相違から検出することを特徴とする請求項1または2に記載の方法。

〔請求項4〕前記光反射層スポットは、前記生体分子プローブ固定化用スポットと、実質的に同一の平面形状を有する請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

〔請求項5〕生体分子プローブ固定スポットに照射する光または励起光がレーザー光である請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

〔請求項6〕前記ターゲット生体分子がDNA、RNA、cDNA、mRNAまたはタンパク質である請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

〔請求項7〕前記特定されたスポット範囲のみからの蛍光データが、蛍光強度のスポット範囲での積算値、平均値または中間値として得られる請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

〔請求項8〕前記特定されたスポット範囲のみからの蛍光データが、蛍光強度のスポット範囲での積算値、平均値または中間値として、各蛍光波長毎に得られる請求項7に記載の方法。

〔請求項9〕生体分子マイクロアレイ上の各スポットについて順次、前記蛍光データが収集される請求項1～8

のいずれか1項に記載の方法。

〔請求項10〕生体分子マイクロアレイ上の複数のスポットについてスポット範囲の特定を行い、次いで、スポット範囲が特定された各スポットが発する蛍光を順次計測し、予め特定されたスポット範囲のデータを用いて、該スポット範囲のみからの蛍光データが、連続的に収集される請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

〔請求項11〕生体分子マイクロアレイ上の一部の領域の生体分子プローブ固定スポットの特定を行い、特定された一部のスポット位置から、全体の生体分子プローブ固定スポットの位置を計算し、該スポット範囲を特定する請求項10に記載の方法。

〔請求項12〕生体分子マイクロアレイ上の全てのスポットについてスポット範囲の特定を予め行う請求項10に記載の方法。

【0006】

【発明の実施の態様】〔生体分子マイクロアレイ〕本発明の生体分子マイクロアレイのデータ収集方法に用いる生体分子マイクロアレイは、光反射層スポット上に生体分子プローブが固定された生体分子プローブ固定スポットを基板表面に複数個有するものである。

【0007】上記生体分子マイクロアレイ用基板の基板は、例えば、ガラス基板、シリコン基板または石英ガラス基板であることができる。上記生体分子プローブ固定化用スポットは、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン及びポリーレーリジン、並びにアミノ基、アルデヒド基、チオール基、カルボキシル基、スクシンイミド基、マレイミド基、エポキシド基及びイソチオシアネート基を有する化合物からなる群から選ばれる少なくとも1種の生体分子プローブ固定化用化合物を所定量固定化することにより形成される。生体分子プローブ固定化用化合物の例としては、以下の化合物を挙げることができる。但し、これらの化合物は例示にすぎず、これらに限定される意図ではない。

【0008】＜アミノ基を有する化合物＞

3-アミノプロピルトリメトキシシラン

N-(2-アミノエチル)-3-アミノプロピルトリメトキシシラン(EDA)

トリメトキシシリルプロピルジエチレントリアミン(DETA)

3-(2-アミノエチルアミノプロピル)トリメトキシシラン

＜アルデヒド基を有する化合物＞

グルタルアルデヒド

＜チオール基を有する化合物＞

4-メルカプトプロピルトリメトキシシラン(MPTS)

＜エポキシド基を有する化合物＞

3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン

＜イソチオシアネート基を有する化合物＞

4-フェニレンジイソチオシアネート (PDITC)
 <スクシンイミド及びマレイミド基有する化合物>
 ジスクシンイミジルカーボネート (DSC)
 スクシンイミジル4- (マレイミドフェニル) プチレート (SMPB)
 m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)
 スクシンイミジル4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (SMCC)
 m-マレイミドプロピオニックアシド-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MPS)

【0009】生体分子プローブ固定化用スポットに固定化される生体分子プローブ固定化用化合物の量は、化合物の種類に応じて適宜決定できる。生体分子プローブ固定化用スポットの形状には特に制限は無いが、例えば、円形であることができ、その直径は、例えば、10～500 μ mの範囲であることができる。また、生体分子プローブ固定化用スポットの形状は、矩形若しくは多角形であることもでき、矩形または多角形の一辺の長さは、例えば、10～500 μ mの範囲であることができる。

【0010】上記の基板は、生体分子プローブ固定化用スポットと基板表面との間に光反射層を有する。さらに、この光反射層は、その上に設けられた生体分子プローブ固定化用スポットと、実質的に同一の形状を有することが好ましい。それにより、光反射層のスポットを検出することにより、生体分子スポットの位置及び面積を自動に認識することができるという利点がある。

【0011】光反射層を構成する物質は、光反射性を有する物質であれば特に制限はない。光反射層は、例えば、金属層であることができ、金属層としては、例えば、アルミニウム、金、銀、プラチナ、ニッケル等を挙げることができる。あるいは、光反射層は、酸化物等からなる単層または多層の反射層であることもできる。

【0012】上記の生体分子マイクロアレイ用基板は、生体分子プローブ固定化用スポットが被覆されていない基板表面に撈水層を有することができる。生体分子プローブ固定化用スポットが被覆されていない基板表面が撈水処理されていることで、生体分子プローブ固定化用スポットへの生体分子プローブの固定化をより正確に行うことができる。撈水層は、既存の撈水剤を用いて形成することができる。撈水剤としては、例えば、シリコンコート剤、フッ素コート剤、ナイロンコート剤、テフロンコート剤 (テフロンは登録商標) 等を用いることができる。

【0013】生体分子マイクロアレイ用基板に固定化される生体分子プローブは、例えば、オリゴDNAまたはcDNAであることができ、本発明の生体分子マイクロアレイ用基板には、DNAマイクロアレイ用基板が含まれる。

【0014】上記の生体分子マイクロアレイ用基板は、

以下の工程を含む製造方法により製造できる。基板表面に光反射層を設ける工程、光反射層の上に生体分子プローブ固定化層を設ける工程、生体分子プローブ固定化層の上にフォトレジスト層を設ける工程、フォトレジスト層をスポット形成用マスクを介して露光する工程、フォトレジスト層を現像する工程、フォトレジスト層にて保護されていない光反射層部分をエッチングする工程、フォトレジスト層を除去する工程を含む本発明の製造方法により製造できる。

【0015】基板表面に光反射層を設ける工程は、例えば、金属を基板表面に蒸着することにより行うことができる。金属の蒸着方法及び条件は、公知の方法及び条件をそのまま用いることができる。尚、金属を基板表面に蒸着する前に、基板表面を洗浄しておくことが好ましい。次いで、光反射層の上に生体分子プローブ固定化層を形成するが、光反射層がアルミニウム層の場合、生体分子プローブ固定化層形成の前に、アルミニウム層表面をエタノールで酸化処理し、さらにアミノシラン化合物を用いてアミノシラン処理することができる。光反射層をアミノシラン処理することで、DNA等の生体分子を物理吸着ではなく化学的固定が可能となるため、その後の操作におけるDNA等の生体分子の損失を少なくすることができるという利点がある。

【0016】光反射層の上に生体分子プローブ固定化層を設ける工程は、光反射層上に生体分子プローブ固定化用化合物を固定化することにより行うことができる。生体分子プローブ固定化用化合物は上記本発明の基板において挙げた物質から適宜選択できる。生体分子プローブ固定化用化合物がビオチンの場合、その固定化は、例えば、ビオチンスクシンイミドエステルをアミノシラン処理した光反射層表面に反応させることで実施できる。生体分子プローブ固定化用化合物がアルデヒド基を有する化合物であるグルタルアルデヒドの場合、その固定化は、グルタルアルデヒドをアミノシラン処理した光反射層表面に反応させることで実施できる。

【0017】生体分子プローブ固定化層の上にフォトレジスト層を設ける工程は、例えば、既存のレジスト材を常法、例えば、スピンコート法によりコーティングし、次いでレジスト材を熱硬化させることで行うことができる。レジスト材の種類、コーティング方法、硬化条件には特に制限はないが、例えば、ポジ型レジスト材をスピンコーターで約1 μ mの厚みにコートし、オーブンで加熱することで、レジストの熱硬化を行うことができる。

【0018】フォトレジスト層をスポット形成用マスクを介して露光する工程は、レジスト材がポジ型又はネガ型かに応じて、所望の寸法、形状及び間隔で生体分子プローブ固定化用スポットが形成されるようなマスクを用意し、このマスクを介して行われる。露光条件は、フォトレジスト材の種類に応じて適宜決定される。

【0019】フォトレジスト層を現像する工程は、露光

したフォトレジスト層を、現像液で処理し、必要により洗浄することで行われる。現像液は、使用するレジスト材に応じて適宜選択できる。

【0020】現像後、フォトレジスト層にて保護されていない光反射層部分をエッチングする。この工程は、光反射層をエッチングできるエッチング液を適宜選択して行われる。例えば、光反射層が金属層の場合、エッチング液は酸水溶液であることができ、酸水溶液に含まれる酸の種類や濃度等は、エッチングすべき金属の種類や層の厚みを考慮して適宜決定できる。

【0021】エッチング後、フォトレジスト層を除去する。この工程は、フォトレジストを溶解できる有機溶媒、例えば、アセトンを用いて行うことができる。フォトレジスト層除去後、必要により洗浄し、本発明の生体分子マイクロアレイ用基板が得られる。

【0022】上記の製造方法においては、エッチング工程とフォトレジスト層除去工程との間に基板表面を撈水処理する工程を含むことができる。この段階で撈水処理することで、生体分子アプローブ固定化用スポットが被覆されていない基板表面に撈水層を形成することができる。撈水処理は、撈水剤の種類に応じて適宜行うことができ、例えば、撈水剤に基板を浸漬することで行うことができる。

【0023】生体分子マイクロアレイは、上記の生体分子マイクロアレイ用基板の生体分子アプローブ固定化用スポットに生体分子アプローブが固定化されたものである。生体分子アプローブ固定スポットは、基板上に複数個設けられる。生体分子アプローブ固定スポットの個数には特に制限はなく、基板の大きさ、スポットの大きさ及びスポットの間隔等を勘案して適宜決定される。固定化された生体分子アプローブは、各生体分子アプローブ固定スポット間で、同一または異なる塩基配列を有することができる。固定化された生体分子アプローブは、例えば、オリゴDNAまたはcDNAであることができる。即ち、本発明の生体分子マイクロアレイには、DNAマイクロアレイが含まれる。

【0024】生体分子アプローブ固定化用スポットへの生体分子アプローブの固定化は、生体分子アプローブ固定化用スポットを形成する生体分子アプローブ固定化用化合物と結合性を有する物質または官能基を生体分子アプローブに予め固定化しておき、例えば、この生体分子アプローブを含む溶液を、本発明の生体分子マイクロアレイ用基板の生体分子アプローブ固定化用スポットに滴下することで、行うことができる。上記結合性を有する物質としては、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、及びビオチンを挙げることができ、上記結合性を有する官能基としては、例えば、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、チオール基、スクシンイミド基、及びマレイミド基を挙げることができる。

【0025】〔データ収集方法〕本発明の第1のデータ

収集方法は、(1)生体分子マイクロアレイに、蛍光標識されたターゲット生体分子を相互作用させるステップ、(2)ターゲット生体分子を相互作用させることにより得られた生体分子マイクロアレイに励起光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光および蛍光を同時に計測するステップ、(3)生体分子マイクロアレイ上の反射光の強度の違いから、光反射層スポットを有する生体分子アプローブ固定スポットを特定するステップ、及び(4)前記で特定されたスポット範囲からの蛍光データを得るステップの4つのステップを含む。

【0026】本発明の第2のデータ収集方法は、(1)生体分子マイクロアレイに、蛍光標識されたターゲット生体分子を相互作用させるステップ、(2)ターゲット生体分子を相互作用させることにより得られた生体分子マイクロアレイに光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光を計測するステップ、(3)生体分子マイクロアレイ上の反射光の強度の違いから光反射層スポットを有する生体分子アプローブ固定スポットを特定するステップ、(4)特定された生体分子アプローブ固定スポット範囲のみに励起光を照射して蛍光を計測するステップ、及び(5)前記で特定されたスポット範囲からの蛍光データを得るステップの5つのステップを含む。

【0027】相互作用ステップ

このステップでは、前記生体分子マイクロアレイに、蛍光標識したターゲット生体分子を相互作用させる。ターゲット生体分子は、例えば、DNA、RNA、cDNA、mRNAまたはタンパク質であることができる。ターゲット生体分子に対する蛍光標識は、公知の方法で行うことができる。生体分子マイクロアレイ上にスポット状に固定された生体分子アプローブとターゲット生体分子との相互作用は、公知の方法及び条件で行うことができる。例えば、DNAアプローブとターゲットcDNAとの相互作用(ハイブリダイゼーション)については、以下の方法で行うことができる。蛍光標識したターゲットcDNAをハイブリダイゼーション溶液に混和し、熱処理によりターゲットcDNAを熱変性させた後、マイクロアレイ上にこの溶液をのせ、カバーガラスをかけ、この溶液が乾かないように密閉した湿箱にいれ、ターゲットcDNA及びDNAアプローブに合わせた適温でハイブリッド形成反応を行う。ハイブリッド形成反応後、未反応のターゲットcDNAを除去するため、塩濃度及び温度を制御した溶液で、マイクロアレイを洗浄する。

【0028】反射光計測ステップ

このステップでは、蛍光標識したターゲット生体分子を相互作用させた生体分子マイクロアレイに光を照射し、生体分子マイクロアレイからの反射光を計測する。生体分子マイクロアレイに照射する光としては、例えば、レーザ光を挙げることができる。レーザ光としては、ガスレーザ、固定レーザ、半導体レーザ等を挙げることができる。レーザの波長及び出力は、用いる蛍光標識により

適宜選択される。また、レーザ光以外の光源としては、例えば、キセノンランプ、水銀ランプ、ハロゲンランプ、メタルハライドランプ等を挙げることができる。生体分子マイクロアレイからの反射光の計測は、受光素子を用いることにより行うことができる。受光素子としては、光電子増倍管、フォトダイオード、CCD素子等を用いることができる。また、反射光を測定する光として、用いる蛍光標識に適した励起光を使用することにより、反射光の測定と同時に蛍光の計測を行うことができる。その場合は、ダイクロイックミラー等により反射光と蛍光を分光し、蛍光を計測する受光素子を、励起光を計測する受光素子とは別に設ける必要がある。蛍光を計測する受光素子としては、光電子増倍管、CCD素子等を用いることができる。

【0029】スポット範囲特定ステップ

このステップでは、反射光計測ステップにより、計測した生体分子マイクロアレイからの反射光の強度データから、光反射層スポットを有する生体分子プローブ固定スポットの範囲を特定する。本発明の方法で用いる生体分子マイクロアレイは、光反射層スポット上に設けられた生体分子プローブ固定スポットを基板表面に複数個有するものである。光反射層スポットの範囲を特定することで、生体分子プローブ固定スポットの範囲を特定することができる。特に、光反射層スポットが、生体分子プローブ固定用スポットと、実質的に同一の平面形状を有する場合、生体分子プローブ固定スポットの範囲の特定をより正確に行うことができる。光反射層スポットは、それ以外の基板表面に比べ、反射率が高いため、光反射層スポットからの反射光の強度は、それ以外の基板表面より高くなり、また各光反射層スポットからほぼ一定の値を得ることができる。そのため、生体分子マイクロアレイからの反射光の強度の閾値を設定することで、光反射層スポットを特定することが可能となる。

【0030】蛍光計測ステップ

反射光計測ステップにより、同時に蛍光計測を行った場合には、このステップは不要となるが、反射光計測ステップ及びスポット範囲特定ステップにより、スポット範囲を特定した後、生体分子プローブ固定スポットのみの蛍光を計測する場合のステップである。スポット範囲を特定した生体分子プローブ固定スポットのみに、励起光を照射し、前記スポットが有する蛍光標識から発生した蛍光を計測する。前記スポットからの蛍光計測には、受光素子を用いることができ、その受光素子としては、光電子増倍管、CCD素子等を用いることができる。

【0031】蛍光データ取得ステップ

このステップでは、前記蛍光計測ステップで得られた蛍光データから、前記スポット範囲特定ステップで特定されたスポット範囲からの蛍光データを得る。このステップでは、生体分子プローブ固定スポット以外の基板表面に付着した蛍光標識されたターゲット生体分子などから

の蛍光は排除され、光反射層スポット上の生体分子プローブ固定スポットに相互作用した蛍光標識されたターゲット生体分子のみからの蛍光データを得ることができる。

【0032】

【実施例】次に、本発明のデータ収集方法について、実施例に基づきより具体的に説明する。

実施例1

デジタルアレイスキャニング法1

マイクロアレイの蛍光を読みとるスキャナーは、大まかにレーザ光源とダイクロイックミラー、カットフィルター及び光電子増倍管から成る(図1)。レーザ光源10から発振されたレーザ光の大部分は、ダイクロイックミラー(A) 11で反射され、対物レンズ12を通して、マイクロアレイ20上の微小領域に照射されるが、ダイクロイックミラー(A) 11を透過するレーザ光もあり、そのレーザ光の光強度を受光素子(A) 13(フォトダイオード、光電子増倍管等)で計測し、レーザ光の反射率の補正值として利用する。ステージ上のマイクロアレイ20から発せられた蛍光と反射されたレーザ光は、対物レンズ12により集光され、次にダイクロイックミラー(B) 14を透過したレーザ光を受光素子(B) 15により計測する。蛍光は、ダイクロイックミラー(B) 14により反射され、カットフィルター16を通して光電子増倍管17で計測される。

【0033】アレイ上の顕微反射率は、次の式から表される。

$$Rf = kP_B/P_A$$

(Rf: アレイ上の顕微反射率、 P_A : 受光素子(A)でとらえたレーザ光源からのレーザ光の出力、 P_B : 受光素子(B)でとらえたアレイからのレーザ光の反射光の出力、k: フィルター及びミラー等の反射率による係数)

【0034】このように反射率の測定は、蛍光計測用のレーザ光を用いて行うため、既存のスキャナーに受光素子(A)と受光素子(B)を取り付けるだけで簡単に行うことができる。また、蛍光測定と同時に反射率測定を行うため、蛍光測定時間を延ばすことなく、反射率の測定が行える。さらに、一つのピクセル座標上に蛍光のデータと反射率のデータが存在することになり、蛍光のデータと反射率のデータの位置がずれることはない。受光素子(A)と受光素子(B)を使うことで、レーザ光源のパワー変動による誤差を補正できる。しかし、レーザ光源のパワー変動が大きくなり、無視できるような場合は、受光素子(A)を省くことができる。

【0035】二種類の蛍光色素(たとえば、Cy3, Cy5)を用いて、1枚のマイクロアレイ上で相対比較を行う場合一つのピクセル座標には、二つの蛍光データが存在することになる。このような場合にもこのデジタルアレイスキャニングは可能である。レーザ光源として二種類ある場合でも同様に、そのうちの一つのレーザ光源の反射率を基に計測すればよい。この場合には、一つのピクセル

座標には、一つの反射率のデータと二つの蛍光データが存在することになる。本発明は、一つのピクセルの大きさを限定するものではないが、生体分子プローブ固定スポットの形状が直径50-500マイクロメートルの円の場合には、1ピクセルの大きさは、5-10マイクロメートルが好ましい。

【0036】解析手法を二種類の蛍光色素(Cy3及びCy5)を用いた場合について、図2に基づいて説明する。スキヤニングした画像を解析する際、生体分子プローブ固定スポットを認識する必要がある。生体分子プローブ固定スポットの認識は、反射率の相違を基に行う(図2最上段)。反射率のデータは、蛍光強度のデータと違い、全生体分子プローブ固定スポットにおいてほぼ一定の値を取るため、一定の閾値を設定することで生体分子プローブ固定スポットのみを認識することが可能となる。各スポットの蛍光強度は、その囲みの中にある蛍光データの積算値、平均値または中間値を計算することで求めることができる(図2、2段目及び3段目)。各生体分子プローブ固定スポットは、相対位置が一定であるので、順番に番号を振ることでそれぞれの位置を識別することができる。この方法では、生体分子プローブ固定スポットの大きさや形、数を設定する必要はなく、自動的に認識することが可能となる。

【0037】実施例2

デジタルアレイスキヤニング法2

本方法は、上記のデジタルアレイスキヤニング法1をさらに高速にするための方法である。この方法では、アレイ上の全領域の蛍光を走査計測し、蛍光画像を取得するのではなく、アレイ上の生体分子プローブ固定スポットのみの蛍光を1点として計測するものである。図3及び4に基づいてさらに説明する。

【0038】生体分子プローブ固定スポットの位置を特定するために、生体分子マイクロアレイのAの領域及びBの領域において連続的に生体分子マイクロアレイを動かす、それぞれの領域に光を照射し、反射率の計測を行う(図3)。Aの領域とBの領域は、アレイの傾きと位置を割り出すために利用するため、対角線に位置している

ことが望ましいが、それに限定するものではない。また、それぞれの領域の広さについても限定しない。領域A及びBの全生体分子プローブ固定スポットにおいて反射率は、ほぼ一定の値を取るため、一定の閾値を設定し、生体分子プローブ固定スポットのみを認識することができる(図4最上段)。認識した各生体分子プローブ固定スポットの領域から、それぞれの中心を求め、全体のスポットの配列の位置を計算する。その際に、生体分子プローブ固定スポットの大きさ、横列の数、縦列の数、ブロック数などのスポットの配列を計算するのに必要なデータを入力する。

【0039】予備計測により求めたスポット配列を基にスポット地点に速やかに生体分子マイクロアレイを移動し、生体分子プローブ固定スポットより小さなあるいは同程度のレーザ焦点径で、各スポットを1点として計測する(図4、2段目、3段目)。その際、生体分子マイクロアレイを動かすためにステージを移動させてもよいし、また、レーザ光を光学的に動かしてもよい。レーザ光の照射により生体分子プローブ固定スポットから発せられた蛍光を計測し、生体分子プローブ固定スポットの蛍光強度とする。次のスポットの測定は、次のスポット地点に速やかにアレイを移動し行う。この方法では、生体分子プローブ固定スポットの蛍光強度を1点としてデジタル的に計測しているため、解析の段階で、スポットを認識し、データ化する必要はなく、計測と同時に数値化されている。また、基板表面の全領域の蛍光を計測する必要はないので、計測と解析のさらなる高速化を実現することができる。

【図面の簡単な説明】

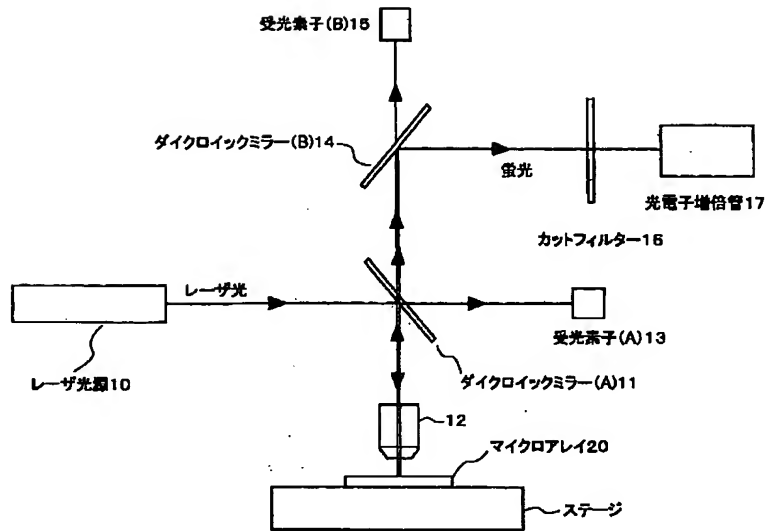
【図1】マイクロアレイの蛍光を読み取るスキヤナーの概略図。

【図2】スキヤニングした画像の解析方法(デジタルアレイスキヤニング法1)の説明図。

【図3】スキヤニングした画像の解析方法(デジタルアレイスキヤニング法2)の説明図。

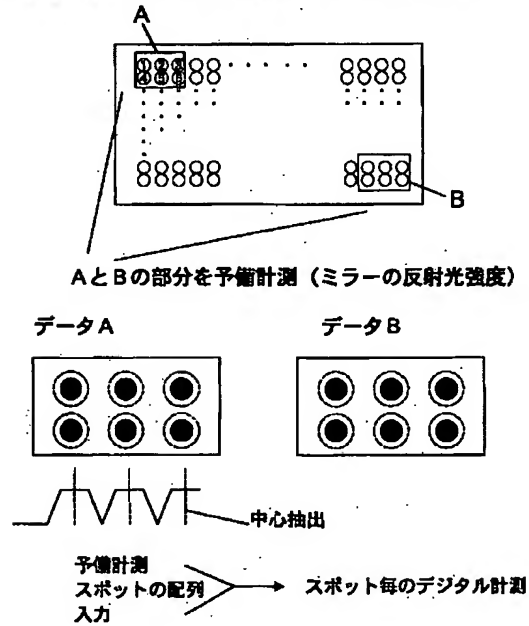
【図4】スキヤニングした画像の解析方法(デジタルアレイスキヤニング法2)の説明図。

【図1】

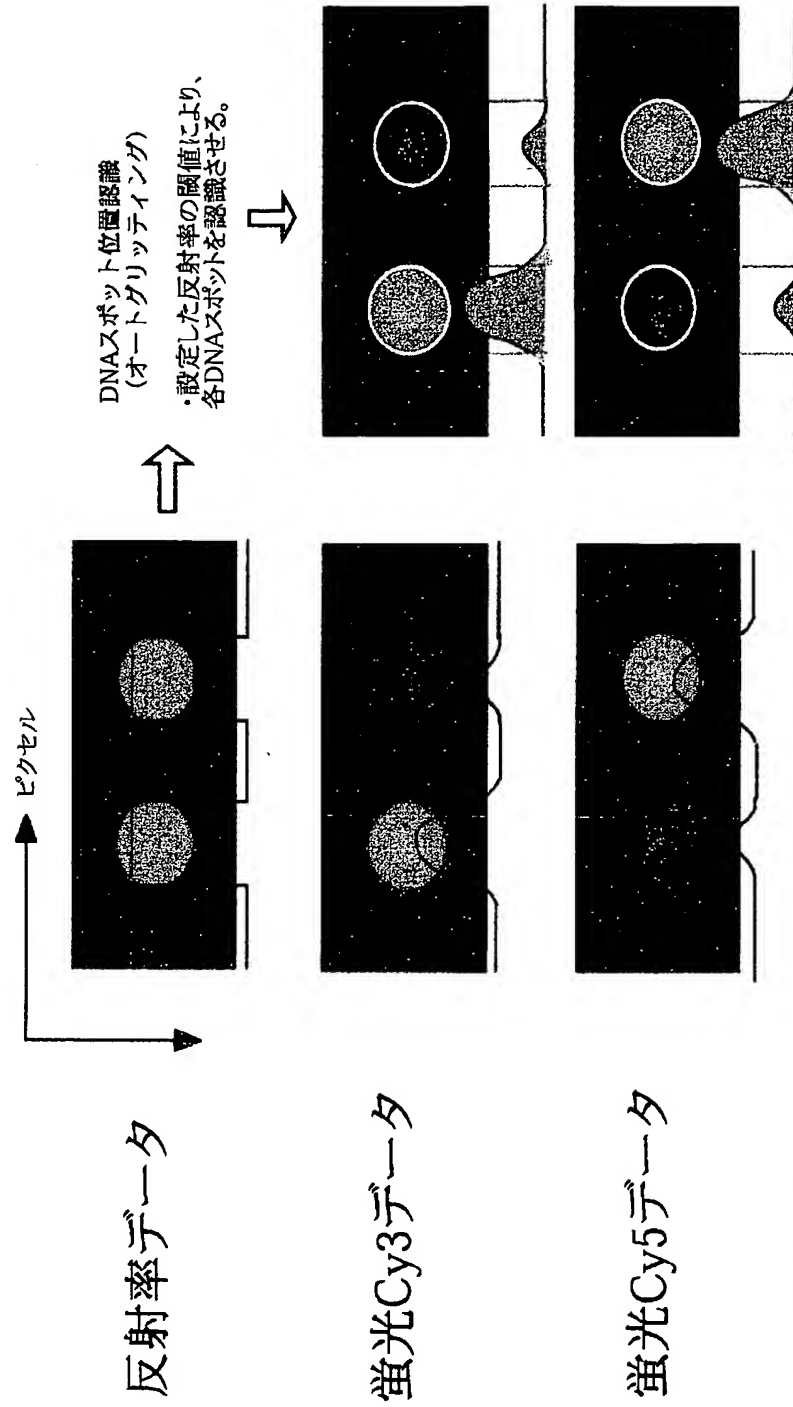


【図3】

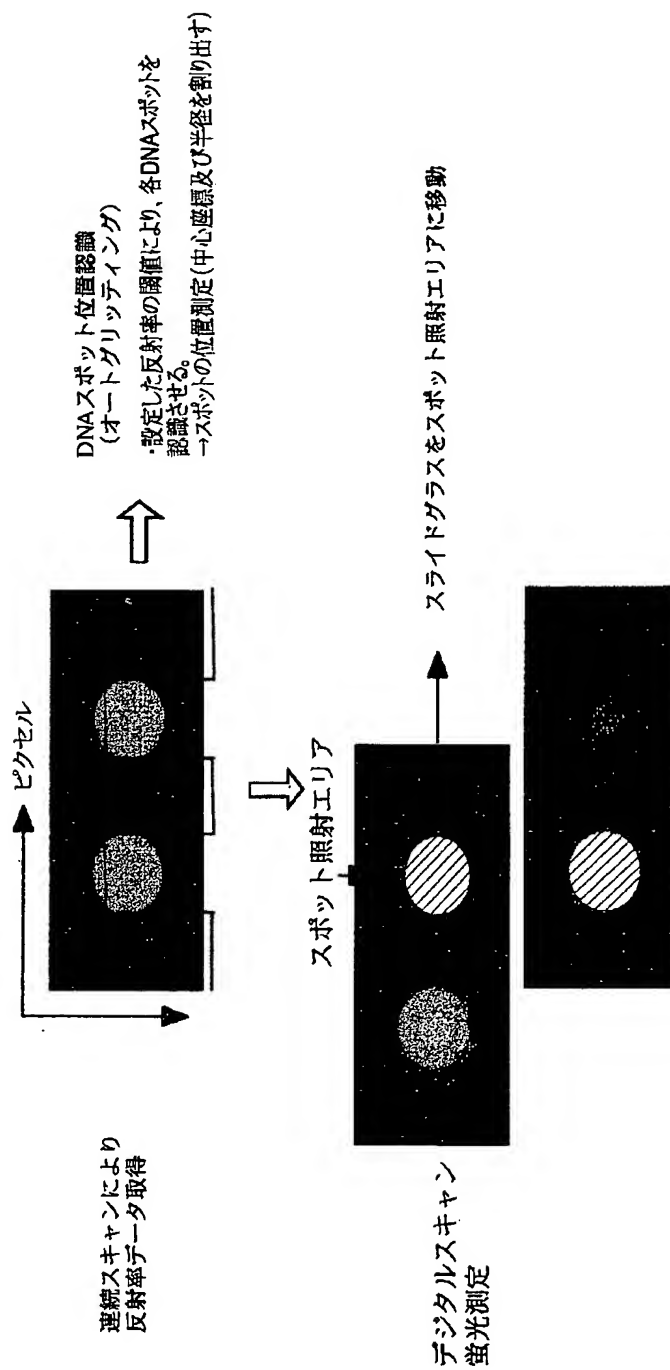
確認のための予備計測
(スポット径 $r_1, < r_2$ は変えない。ただし、スライドガラスの挿引は連続計測にしてスポット位置を割り出せるようにする。)



【図2】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷
// C 1 2 Q 1/68

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00

テーマード(参考)
F

Best Available Copy

(特 1) 103-156442 (P2003-+ 藤 莉)

(72) 発明者 橘内 徳司
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 理化学研究所
内

F ターム (参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 EA01 EA14
FA02 FA06 GA01 GB01 GB16
HA01 HA02 JA02 KA09 LA02
LA03 NA01 NA05
2G059 AA05 BB08 BB12 CC16 EE02
FF01 GG01 JJ02 JJ13 KK02
KK04 MM01 MM05
4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 HA13
HA14 HA19
4B063 QA18 QQ42 QQ52 QR56 QR62
QR82 QS34 QS39

Best Available Copy

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.